

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление «Медицина»

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

на тему: Морфогенез гамартом легкого

Выполнил студент 15.С04-м группы

Громов Максим Владимирович

Научный руководитель: к. м. н., доцент.

Новицкая Татьяна Александровна

Санкт-Петербург

2021

## Оглавление

Список сокращений .....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1 Гамартомы легкого .....	7
1.1.1 Эпидемиология.....	8
1.1.2 Гистохимические свойства.....	10
1.1.3 Иммуногистохимическое исследование .....	10
1.1.4 Редкие варианты гамартом легкого.....	12
1.1.5 Генетические аномалии гамартом легкого.....	14
1.2 Соматические стволовые клетки .....	14
Глава 2. Материалы и методы.....	18
Глава 3. Результаты.....	19
3.1 Результаты гистологического исследования.....	20
3.1.1 Хондронидная гамартома легкого .....	20
3.1.2 Фиброзная гамартома легкого .....	21
3.1.3 Лейомиоматозная гамартома легкого .....	21
3.2 Морфогенез гамартом легкого.....	22
Заключение .....	33
Выводы .....	36
Список литературы .....	37

## Список сокращений

CD – cluster of differentiation – кластер дифференцировки

$\alpha$ -Sma –  $\alpha$ -smooth muscle actin – гладкомышечный актин альфа

bFGF – basic fibroblast growth factor – базовый фактор роста фибробластов

СК – цитокератин

SP-A – surfactant protein A – белок сурфактанта А

BCL2 – apoptosis regulator Bcl-2 – регулятор апоптоза Bcl-2

STAT6 – Signal transducer and activator of transcription 6 - сигнальный белок и активатор транскрипции 6

KRT – кератин

EMA – Epithelial membrane antigen – мембранный антиген эпителия

TAC – Transit-amplifying cells - транзитные амплифицирующие клетки

ASC – adult stem cells – мезенхимальные соматические стволовые клетки

CCO – cancer cell of origin – клетки предшественники опухоли

## **Введение**

С момента описания гамартомы в 1904 году Альбрехтом, природа гамартом легкого оставалась предметом дискуссий вплоть до конца XX века, когда после идентификации мутаций в их геноме, было окончательно решено, что гамартомы легкого являются истинными новообразованиями, а не пороком развития. В ходе изучения данных новообразований исследователи уделяли внимание в основном вопросам диагностики и статистики. Лишь немногие работы рассматривали вопрос происхождения гамартом легкого, основываясь на изучении их микроструктуры и иммуногистохимических свойств.

Актуальность данной работы заключается в том, что в исследованиях, проводимых ранее, объектом исследования являлся непосредственно солидный компонент опухоли, тогда как данная работа посвящена оценке ткани легкого, окружающей опухолевый узел, где возможно микроскопически обнаружить структуры, которые могут являться морфологическим субстратом для развития гамартомы легкого.

### **Цель:**

Описать морфогенез гамартом легкого

### **Задачи:**

1. Произвести отбор материала для исследования путем ретроспективного анализа архивных данных
2. Исследовать отобранный материал с применением метода световой микроскопии
3. Произвести анализ отечественной и иностранной литературы по заданной тематике
4. Сделать выводы на основании полученных результатов

## **Практическое значение:**

Хотя гамартомы не являются злокачественными новообразованиями, тем не менее изучение вопроса об их происхождении может внести вклад в расширение понимания процессов канцерогенеза.

В ходе недавних исследований было доказано, что клетки в составе опухолей представлены в виде гетерогенных по своим свойствам популяций. В последнее десятилетие было разработано две основные модели, которые объясняли данную гетерогенность: модель клональной эволюции (мутационная гипотеза) и модель раковых стволовых клеток.

На данный момент вполне очевидно, что развитие опухолевого процесса происходит за счет неконтролируемой пролиферации клеток, имеющих критическое количество мутаций в своем генотипе. Данные клетки предшественники опухоли также гетерогенны, и опухоль может происходить как из соматической клетки, так и из стволовой клетки. В дальнейшем, по мере прогрессирования процесса клетки могут терять свою исходную морфологию и молекулярные особенности, присущие клетке предшественнику [1]. Идентификация таких клеток предшественниц опухолей значительно способствовала бы созданию более эффективных методов лечения и профилактики новообразований. Имея возможность идентифицировать и прицельно воздействовать на такие исходные клетки, было бы возможно остановить опухолевый процесс до его распространения. Молекулярные или физиологические особенности, специфичные для исходных опухолевых клеток, можно было бы использовать для замедления или блокирования прогрессии опухоли, что позволит отказаться от применения системной цитостатической терапии. На данный момент прилагаются значительные усилия по идентификации клеток предшественников для всех типов новообразований, и многочисленные свидетельства указывают на стволовые клетки, как на возможные клетки предшественники опухоли [2].

Что касается гамартом легкого, то определение источника морфогенеза для данных образований позволит поставить точку в вопросе о том, является ли гамартома легкого опухолью *de novo* или продуктом эмбриогенеза, претерпевшим опухолевую трансформацию [3].

# Глава 1. Обзор литературы.

## 1.1 Гамартомы легкого

Гамартома легкого — доброкачественное новообразование из как минимум двух мезенхимальных компонентов (таких как хрящ, соединительная ткань, жир или гладкомышечная ткань), сочетающихся с респираторным эпителием.

Термин «гамартома» был впервые предложен немецким ученым Albrecht в 1904 году при описании дизэмбриоплазии печени для обозначения опухолеподобной мальформации, состоящей из компонентов типичных для органа, но расположенных аномально. Данный термин применялся для любых образований дизонтогенетического характера, таких как пигментные невусы, сосудистые мальформации и пр. В настоящее время данное нозологическое понятие применяется в основном в отношении гамартомы легкого

Гистогенез гамартом легкого обсуждался некоторыми авторами, но на данный момент, учитывая обнаруженные в геноме этих образований хромосомные aberrации, принято считать, что гамартома легкого является истинной неоплазией, а не врожденным пороком развития. [4] Являются ли гамартомы следствием реактивного ответа на воспаление до сих пор не ясно, но учитывая высокую частоту воспалительных заболеваний легких и относительно низкую частоту выявления гамартом вкупе с их солитарным строением, тогда как воспаление обычно протекает с множеством фокусов, воспалительная причина возникновения гамартом маловероятна. Окружающая ткань легкого и бронхов обычно интактна при первичном выявлении гамартом, поэтому исследователи предполагают, что они наиболее вероятно представляют собой доброкачественные новообразования, чей рост контролируется пока что неизвестными факторами. Tomashefski описывал гамартомы легкого, как мезенхимому, что довольно точно описывает комбинацию тканей в гамартомах [5]. Железистые включения в гамартоме

легкого встречаются довольно часто. В прошлом гистогенез данных образований вызывал сомнения, Bateson и соавторы [6] в серии исследований доказали, что данный железистый компонент является результатом метаплазии клеток альвеол и бронхиол, что было в последствие также подтверждено данными электронной микроскопии. [7] В гамартомах также были найдены ядерные включения, находящиеся в альвеолярных и метапластических эпителиальных клетках, выстилающих щелевидные полости, которые, возможно, представляют собой сурфактант [7]. Такие включения встречаются также в первичных новообразованиях легкого низкой степени злокачественности и даже в метастазах [8].

Дополнительные доказательства развития гамартом в результате неопластической трансформации были представлены Fletcher et al [9]: в ходе исследования 17 случаев хондронидных гамартом легкого в 10 были идентифицированы клональные хромосомные aberrации в мезенхимальных клетках. В четырех случаях - перестройка 12q-15, в одном случае – транслокация  $t(12:14)(q15;q24)$ , которая идентична транслокации, характерной для лейомиом матки.

Наиболее значимыми исследованиями на тему гамартом легкого являются работы van den Bosch et al. [10] и Gjevre et al. [11] Исследование van den Bosch et al. предоставило данные о том, что гамартумы легкого являются доброкачественным новообразованием, а не пороком развития на основании возраста, заболеваемости и прогрессивного роста. Исследование Gjevre, включавшее 215 случаев обнаружило, что значительное число пациентов (29,3%) имело сопутствующие новообразования, чаще всего – карциному легкого, и в этом исследовании не было обнаружено признаков злокачественной трансформации гамартумы легкого.

### **1.1.1 Эпидемиология**

Гамартумы являются самыми распространенными доброкачественными новообразованиями легкого. Оценка истинной частоты встречаемости



затруднена, так как опухоли, состоящие преимущественно из хрящевой ткани, могут быть расценены патологом как хондроидная гамартома или как хондрома. В исследовании McDonald et al. среди 7972 исследованных аутопсий было обнаружено 20 гамартом, что соответствует распространенности в 1 случай на 400 аутопсий [12]. Заболеваемость среди мужчин в 4 раза выше, чем среди женщин. Чаще выявляются в возрастной группе от 30 до 70 лет, пик заболеваемости приходится на 50-60 лет. Редкие случаи гамартом легкого регистрируются и среди детей, но не у новорожденных. Редко гамартумы встречаются в ассоциации с другими образованиями, такими как, например, гемангиома. Столь же редким является возникновение изолированных метастазов из внелегочной опухоли в гамартому легкого [13].

Как и в других органах, гамартумы легкого представляют собой фокус избыточного и беспорядочного роста клеток и тканей, свойственных данному органу. При микроскопическом исследовании в большинстве гамартом легкого присутствует зрелый хрящ: в 82% эндобронхиальных и 96% паренхиматозных. [5] Относительная доля хряща также варьирует в зависимости от месторасположения образования. Для центральной локализации более характерен гиалиновый хрящ, а для периферической – сочетание гиалинового и волокнистого хряща. Гиалиновый хрящ в хондроидных гамартомах всегда окружен соединительнотканым компонентом, часто это - зрелая жировая ткань. Иногда другие тканевые компоненты монотонны и составляют преобладающую массу без хряща, как это происходит с липомами и, возможно, фибромами и миксомами легких и бронхов. Некоторые исследователи выделяют последние поражения отдельно, а другие считают этапом развития гамартумы. В редких случаях жировые клетки оказываются нетипичными, редко может быть кость, а иногда и ущемленные сосуды, бронхиолы или различное, но обычно небольшое количество гладких мышц. Однако в некоторых случаях компонент гладких

мышц может быть значительным, придавая некоторым поражениям фибролейомиоматозный вид [8].

### **1.1.2 Гистохимические свойства**

Фибромиксоидная строма гамартомы и хрящевая ткань демонстрируют метакромазию при окраске толуидиновым синим (pH 4.1). Окраска по Ван-Гизону выявляет отсутствие в ткани опухоли нормальной архитектуры, характерной для паренхимы легкого. На периферии опухолевого узла выявляются инфильтрация лимфоцитами, мастоцитами и плазматическими клетками [14].

### **1.1.3 Иммуногистохимическое исследование**

Хондроциты зрелой хрящевой ткани, перихондральные веретеновидные клетки, звездчатые и веретеновидные клетки фибромиксоидной ткани и адипоциты выраженно окрашиваются на S-100 белок. В некоторых случаях отмечалось присутствие S-100 позитивных дендритных клеток в составе выстилающего хрящ эпителия.

Фибронектин выявляется в перихондральных веретеновидных клетках в звездчатых и веретеновидных клетках фибромиксоидной ткани. Окрашивание на фибронектин также положительно в матриксе вокруг хондроцитов и в миксоидном матриксе.

Окраска на виментин положительна в перихондральных веретеновидных клетках в звездчатых и веретеновидных клетках фибромиксоидной ткани. Также положительная в хондроцитах, особенно в тех, которые локализованы периферически.

Окрашивание на CD34 изредка позитивно в перихондральных веретеновидных клетках и иногда в некоторых веретеновидных клетках фибромиксоидной ткани. Реактивность к CD34 демонстрирует недостаток капилляров в хондроидных гамартомах легкого.

Окрашивание на  $\alpha$ -Sma позитивно в перихондральных веретеновидных клетках, некоторых веретеновидных клетках фибромиксоидной ткани и гладкомышечных клетках. Звездчатые клетки хондроидного матрикса также иногда позитивно окрашивались на  $\alpha$ -Sma.

Окрашивание на bFGF положительно цитоплазме хондроцитов, веретеновидных и звездчатых клеток фибромиксоидной ткани и иногда перихондриальных веретеновидных клеток. bFGF положительные звездчатые клетки. bFGF-положительные звездчатые и веретеновидные клетки были организованы как фрагмент незрелой хрящевой ткани без надхрящницы, имеющий эллипсоидную форму.

Коллаген I типа обычно расположен по периферии хряща, в области незрелой хрящевой ткани и в фибромиксоидном матриксе. Коллаген 2 типа располагается преимущественно в матриксе хрящевой ткани. Коллаген 3 типа преимущественно локализован в фибромиксоидном матриксе.

Что касается нормального бронхиального хряща, то в нем хондроциты выраженно окрашиваются на S-100 и bFGF, перибронхиальные веретеновидные клетки положительно окрашиваются на виментин, иногда положительно окрашиваются на S-100 и bFGF. Перихондральные веретеновидные клетки отрицательны при окраске на CD34 и  $\alpha$ SMA как у новорождённых, так и у взрослых. Окраска на коллаген 1, 2 и 3 типов в нормальном бронхиальном хряще аналогична таковой в хондроидной гамартоме легкого. Клетки незрелой хрящевой ткани в стенке бронха у новорожденных позитивно окрашиваются на S-100, в тоже время как примитивные мезенхимальные клетки в той же области иногда слабо-позитивны на bFGF, но отрицательны при окраске на S-100, CD34, виментин или SMA.

Эпителиальные клетки, включая реснитчатый и не реснитчатый бронхиальный, бронхиолярный и альвеолярный эпителий, позитивно

окрашивались на CK7. Окраска CC10 была положительна практически во всем не реснитчатом эпителии бронхов, выстилающем хрящ в составе хондройдной гамартомы, а SP-A в большей части этих клеток был негативен, за исключением некоторого окрашивания секреторируемого материала в щелевидных пространствах на периферии опухоли [14].

#### **1.1.4 Редкие варианты гамартом легкого**

##### **1.1.4.1 Лейомиоматозные гамартомы**

Гамартома, состоящая преимущественно из гладкомышечных клеток впервые была описана Cruickshank et al. в 1953 г. Данный вариант встречается значительно реже хондройдных гамартом легкого. [15] В литературе данный тип гамартом описывается под различными названиями «аденолейомиоматозная гамартома», «фибролейомиоматозная гамартома», также были описаны случаи сочетания в гамартоме гладкомышечных клеток и железистого эпителия, в частности случай с преобладанием железистых клеток, описанный Zhang et al [16], как «периферическая железистая аденома с гладкомышечной стромой». Учитывая данные статей, сообщающих о лейомиоматозных гамартомах, то пик выявляемости данных образований приходится на 50-60 лет, при этом у мужчин они встречаются в 5 раз чаще, чем у женщин. У всех пациентов данное образование не вызывало симптомов. В различных случаях сообщалось о возможных вариантах эпителиального компонента лейомиоматозной гамартомы: обычно гамартома легкого выстлана мономорфными альвеолоцитами 2 типа без признаков атипии или реснитчатым эпителием. Гораздо реже встречается железистый эпителий, так Takeshima et al [17] сообщали о лейомиоматозной гамартоме, содержащей реснитчатый бронхиальный эпителий, тогда как Yamada et al [18] и Zhang et al [16] показали в своих работах присутствие p63 позитивных базальных клеток, окружающих бронхиальные железы. Itoh et al [19] и Jin et al. [20] в своих наблюдениях описывали, что слизистые железы имели неоднородную структуру и распределение в гладкомышечной ткани и состояли из клеток

цилиндрического эпителия с присутствием бокаловидных клеток, при этом не было отмечено признаков атипичии и фигур митоза. В этих двух случаях не было описано присутствия базального слоя клеток, но также и не проводилось окрашивание на p63 или маркеры базальных клеток. [21]

Okudeka et al. в свою очередь привели клинический случай фибролейомиоматозной гамарты легкого эпителиальный компонент которой был представлен в основном не реснитчатым призматическим эпителием, а мезенхимальный компонент гладкомышечной тканью и фибробластами. Эпителиальные клетки, образующие железы были поляризованы, без признаков полиморфизма или атипичии. При иммуногистохимической окраске эпителий был позитивен на TTF1, SPA, KRT, отрицателен на p53, CD99, CD34, BCL2, и STAT6, а индекс Ki67 был равен 0.2%. Гладкомышечные клетки и фибробласты положительно окрашивались на виментин, альфа-гладкомышечный актин, Anti-muscle Actin antibody [HNF35] и рецепторы прогестерона, а отрицательны при окраске на CD34, desmin, caldesmon, KRT, EMA, TTF1, SPA, CD99, CD34, BCL2, and STAT6 и p53, Ki67 = 0.3%. [22]

Еще об одном случае гамарты состоящей преимущественно из гладкомышечных клеток сообщили Miyaoka et al. Данный случай примечателен тем, что данная гамартома является гигантской, ее размеры составляли 13\*10\*8 см, при этом в составе опухоли присутствовала еще и киста размерами 8\*6,5\*5. Преобладающей в солидном компоненте была гладкомышечная ткань, выстланная железистым эпителием, а жировая ткань и хрящ составляли лишь небольшую часть образования. Микроскопически солидная область состояла в основном из веретеновидных клеток с вытянутыми тупоконечными ядрами с эозинофильной цитоплазмой, а также небольшого участка жировой и хрящевой ткани. Веретеновидные клетки образовывали пучки. Клеточность была невысокой. В гладкомышечной ткани было множество щелей, выстланных кубическим реснитчатым эпителием, а

также микроскопически наблюдались сосуды с вереновидноклеточным компонентом. По данным иммуногистохимического исследования гладкомышечный компонент положительно окрашивался на smooth muscle actin (SMA), desmin и CD34, слабо позитивен при окраске на рецепторы эстрогена, отрицательное окрашивание было получено в отношении HMB-45, Melan A и рецептора прогестерона. Такие данные позволили установить, что веретенновидные клетки относятся к гладкомышечной ткани. Эпителиальный компонент положительно окрашивался на TTF1, что указало на респираторный эпителий. Эндотелий сосудов положительно окрашивался на D2-40. [23]

### **1.1.5 Генетические аномалии гамартом легкого**

Гамартомы легкого имеют уникальный генетический профиль, который помогает окончательно дифференцировать их от других доброкачественных новообразований легкого. Наиболее частая хромосомная аномалия – это перестройки 6p21; 12q14-q15 и, редко, обе эти аномалии одновременно. Реципрокная транслокация  $t(6;14)(p21;q24)$  – самая частая хромосомная перестройка в гамартомах легкого, которая приводит к слиянию участков хромосомы, содержащих части генов HMGIY (high mobility group gene) и RAD51L (ген кодирующий протеинкиназу). Перестройки 12q14-q15, включающие HMGA2 могут быть выявлены примерно в 80% гамартом легкого, даже в случаях с практически нормальным кариотипом. Интересно, что перестройка HMGA2 в гамартомах легкого имеет такие же break points, как и в других опухолях мезенхимального происхождения, включая лейомиомы, липомы и плеоморфные аденомы. [24]

### **1.2 Соматические стволовые клетки**

Соматические стволовые клетки являются мишенью для онкогенеза благодаря нескольким основным свойствам. Во-первых, они имеют продолжительный период жизни и, следовательно, способны сохраняться достаточно долго, чтобы накапливать повреждения ДНК. Во-вторых, эти

клетки в целом мультипотентны (иногда унипотентны), и это может объяснить вариабельность типов клеток, обнаруженных в большинстве опухолей. В-третьих, соматические стволовые клетки, хотя обычно находятся в состоянии покоя, обладают значительным потенциалом самообновления, что может иметь решающее значение для распространения опухоли. Соматические стволовые клетки также способны давать начало ограниченному числу типов клеток [25,26]. Например, кишечные стволовые клетки способны дифференцироваться во все различные типы секреторных клеток ворсинок, но не в клетки мозга или мышечные клетки. Наконец, экспериментальные данные по отслеживанию клонов подтверждают, что стволовые клетки взрослых на самом деле могут быть клетками предшественниками опухолей в различных солидных опухолях [2]. Однако были выявлены многочисленные исключения из этой теории. Соматические стволовые клетки обнаруживаются во многих органах взрослого человека и необходимы для поддержания гомеостаза тканей, а также для регенерации в ответ на повреждение [27, 28, 29]. Соматические стволовые клетки в ходе своего жизненного цикла дают начало многолинейным ограниченным предшественникам или, как их часто называют, транзитным амплифицирующим клеткам (ТАС). Эти клетки быстро делятся, а затем дифференцируются с образованием основной массы клеток, необходимых для обновления или регенерации тканей. Из-за их быстрого деления ТАС также являются точкой приложения химиотерапевтических препаратов, что наиболее наглядно проявляется в потере волос и клеток кишечника. В большинстве случаев ТАС быстро дают начало терминально дифференцированным клеткам, которые затем выполняют основные функции ткани или органа. Этот тип иерархии присутствует в большинстве тканей, хотя такие ткани, как эпидермис и кишечник, подвергаются обновлению тканей и цикличности стволовых клеток с большей частотой [30]. Хотя идентичность ASC подтверждена не во всех тканях, считается, что большинство тканей обладают ими, за некоторыми заметными и спорными исключениями (печень и поджелудочная железа). Считается, что эти ткани регенерируют путем

дифференцировки дифференцированного типа клеток обратно в пролиферативное состояние. Однако считается, что это происходит только в случаях регенерации в ответ на повреждение ткани; примером является печень, где зрелые гепатоциты возвращаются в пролиферативное состояние в ответ на гепатэктомию [31, 32, 33]. Клеточные иерархии, основанные на потенциале развития (способности производить более дифференцированное потомство), существуют во всех тканях, причем стволовые клетки и окончательно дифференцированные клетки находятся на противоположных концах спектра. По-видимому, ASC регулируются внутренними и внешними механизмами. ASC по своей сути отличаются от своего потомства на основе эпигенетических, транскрипционных и потенциально метаболических способов регуляции [34, 35]. Нарушение регуляции этих внутренних факторов, такие как появление онкогенных мутаций, может привести к возникновению неоплазии [36]. Более того, внешняя среда, в которой находятся ASC, также регулирует их идентичность и активность. ASC живут в специализированных нишах, которые часто состоят из нескольких разных типов клеток, часто из разных зародышевых листков эмбриона [37]. ASC отправляют и получают сигналы из своей ниши, такие как факторы роста, ассоциация внеклеточного матрикса и механическая регуляция. Нарушение этой перекрестной передачи сигналов или изменения в составе ниши могут повлиять на различные аспекты гомеостаза ASC, такие как индукция пролиферации.

Опухоли неоднородны и могут демонстрировать различные фенотипические признаки, такие как морфология, экспрессия генов и пролиферация. Было высказано предположение, что окончательная морфология клеток в опухоли может определять ССО; однако раковые клетки претерпевают множество изменений в процессе от начала опухоли до прогрессирования, что позволяет предположить, что конечная опухолевая клетка может иметь мало общего с ССО. Следовательно, априори возможны



несколько сценариев возникновения опухоли. С учетом этого были сделаны попытки выявить источник происхождения неоплазий для различных локализаций. Эксперименты с применением технологии введения онкогенов или удаления опухолевых супрессоров в постнатальных моделях мышей [3, 8, 39, 40] показали, что ретроспективные исследования существующей опухолевой ткани человека или мыши могут вводить в заблуждение при попытке идентифицировать ССО. Простейшая интерпретация данных, полученных с помощью этих новых перспективных подходов, состоит в том, что ASC с большей вероятностью будут выступать в качестве ССО при многих опухолевых заболеваниях, таких как рак кожи, простаты, кишечника и мозга. Поскольку ASC постоянно доступны для поддержания тканевого гомеостаза и восстановления клеточных компартментов, утраченных во время повреждения в ткани, было высказано предположение, что только ASC присутствуют в ткани в течение достаточного периода времени для накопления необходимых генетических мутаций для канцерогенной трансформации и инициации рака.

## Глава 2. Материалы и методы

Поиск литературы осуществлялся в базах данных PubMed, Google Scholar и eLibrary.

Проведено гистологическое исследование гамартом легкого, удаленных у 75 пациентов (38 мужчин и 37 женщин) в возрасте от 16 до 82 лет, средний возраст 55 лет, Исследование проводилось на базе патоморфологической лаборатории ФГБУ «СПб НИИ Фтизиопульмонологии» Минздрава России. Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в таблице 1.

Был исследован операционный материал. Полученные образцы ткани фиксировались в течение 24 ч в 10% растворе нейтрального забуференного формалина. При фиксации применяются для минимизации ошибок стандартные растворы и протоколы фиксации, валидизация реактивов.

На этапе проводки фиксированные образцы обрабатывают последовательно серией растворов спирта, ксилола, а затем горячего парафина. После соответствующей обработки (обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации) образцы эндометрия заключали в парафин с формированием парафиновых блоков. Затем на микротоме изготавливаются гистологические срезы толщиной не более 3-5 мкм. Эти срезы помещаются в емкость с водой и там переносятся на стекла с адгезивным составом. Затем проводится процедура депарафинизации срезов, затем срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Препараты были подвергнуты изучению при помощи светового микроскопа. В дальнейшее исследование было включено 9 препаратов, содержащих в окружающей гамартomu ткани легкого признаки пролиферации мезенхиамальных элементов, а также 2 препарата, имеющие типичную морфологическую картину солидного компонента гамартомы легкого. Были выполнены микрофотографии выбранных препаратов.

### Глава 3. Результаты

Данные касательно половозрастной характеристики проанализированных случаев суммированы в Таблице 1. Количество выявленных случаев среди мужчин примерно равно таковому среди женщин. Средний возраст среди мужчин 54,5 лет, медиана возраста 55 лет, самый молодой пациент – 19 лет, самый пожилой – 82 года, пик заболеваемости приходится на возраст 50-60 лет. Среди женщин средний возраст составил 53,8 года, медиана возраста 55 лет, самая молодая пациентка – 16 лет, самая пожилая 75 лет, пик заболеваемости приходится на возраст 50-70 лет.

Таблица 1

Распределение пациентов по полу и возрасту.

Возраст	Мужчины, n	Женщины, n
10 - 20 лет	1	1
20 - 30 лет	0	1
30 - 40 лет	4	0
40 - 50 лет	4	8
50 - 60 лет	20	13
60 - 70 лет	5	12
старше 70 лет	4	2
Всего, n:	38	37

По результатам количественного анализа заключений было установлено, что из 75 случаев гамартом легкого на хондройдный тип пришлось 93,3% (70 случаев), на фиброзный 4% (3 случая) и на лейомиоматозный 2,6% (2 случая).

### **3.1 Результаты гистологического исследования**

Все 75 рассмотренных гамартом работы обнаружили типичную гистологическую картину, включающую в себя нарушение микроархитектоники тканей присущих данному органу, присутствие в составе опухоли хотя бы двух производных мезенхимы, а также эпителий, выстилающий щелевидные пространства. При этом не было отмечено признаков некроза, ядерной атипии и повышения митотической активности. Опухолевые узлы были инкапсулированы и отграничены от паренхимы легкого слоем соединительной ткани. При наличии в срезе паренхимы легкого в ней отмечались воспалительные изменения, очаги ателектаза и иногда – эмфиземы.

#### **3.1.1 Хондроидная гамартома легкого**

Все 70 хондроидных гамартом легкого, рассмотренных в рамках данной работы, обнаружили типичную гистологическую картину. Макроскопически представляли из себя плотный узел белесоватого цвета. При микроскопическом исследовании преобладающим компонентом является гиалиновый хрящ, зачастую с признаками дегенерации, на периферии располагалась жировая ткань, кроме того, в рамках солидного компонента опухоли обнаруживаются щелевидные пространства, выстланные эпителием бронхиального типа (Рис. 1). В некоторых препаратах также присутствовали пучки плотной соединительной ткани и элементы костной ткани. По периферии узел был отграничен соединительной тканью от ткани легкого.

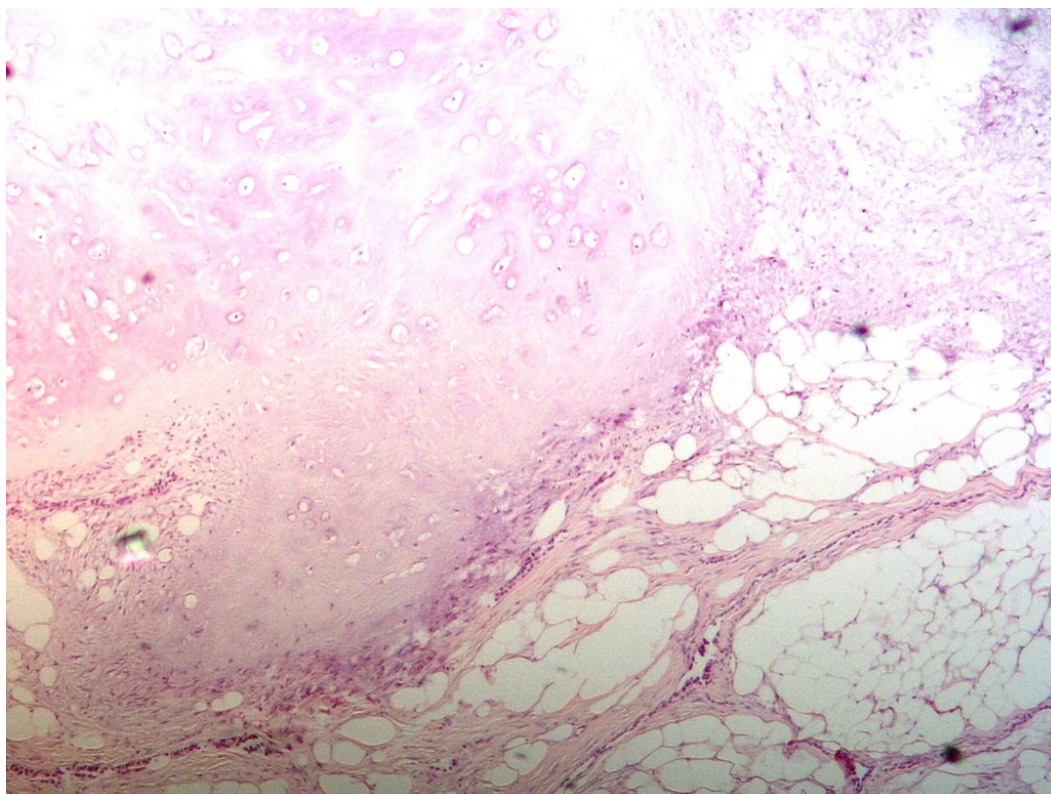


Рисунок 1 – Хондронидная гамартома легкого. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

### **3.1.2 Фиброзная гамартома легкого**

Фиброзные гамартумы легкого характеризовались доминированием фибромиксоидного компонента, состоящего из мелких веретеновидных клеток, с преобладанием межклеточного вещества, окрашенного слабо базофильно. Также присутствовали включения жировой ткани и эпителий бронхиального типа, выстилающий щелевидные пространства.

### **3.1.3 Лейомиоматозная гамартома легкого**

Лейомиоматозные гамартумы состоят преимущественно из клеток с веретеновидным ядром, образующих пучки. Цитоплазма окрашивается эозинофильно, не содержит включений. Щелевидные пространства между фрагментами гладкой мускулатуры также выстланы бронхиальным призматическим реснитчатым эпителием (Рис. 2).

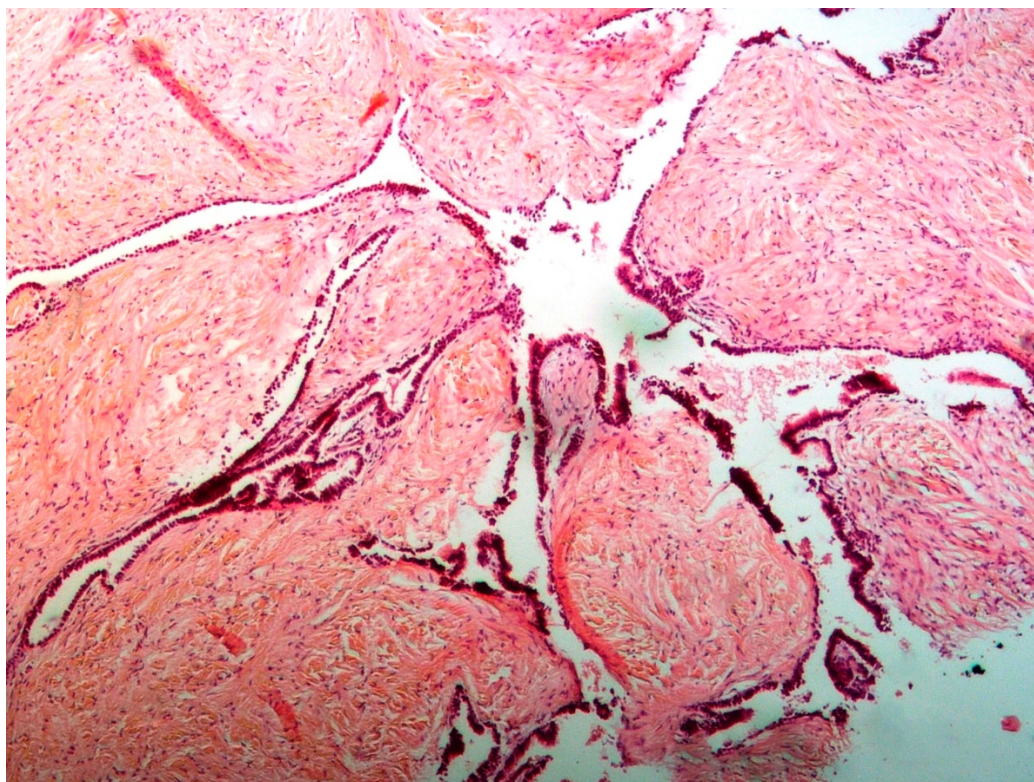


Рисунок 2 – Лейомиоматозная гамартома. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

### 3.2 Морфогенез гамартом легкого

Было проведено тщательное исследование ткани легкого, если таковая имелась в препарате, на предмет пролиферации мезенхимальных клеток, которые, как предполагается, могут являться предшественниками гамартумы легкого.

Признаки пролиферации мезенхимальных элементов были обнаружены в 9 препаратах. В случаях хондройдной гамартумы легкого данные элементы располагались пределах в легочной ткани, которая входила в край резекции опухолевого узла, а именно в стенках терминальных бронхиол, где в норме хрящ отсутствует. В отобранных препаратах можно отметить некоторые морфологические признаки, которые характеризуют новообразованные мезенхимальные элементы. Так на Рис.3, 4 и 5 визуализируется группа клеток, расположенная перибронхиально, клетки относительно крупные, содержат небольшое светлое ядро, расположенное преимущественно центрально,



цитоплазма окрашивается эозинофильно, без включений. Межклеточное вещество не выражено. Кроме того, присутствуют базофильно окрашенные клетки со светлой цитоплазмой и периферически расположенным мелким ядром, что особенно заметно на Рис. 3. По периферии данные образования окружены несколькими слоями клеток с вытянутыми ядрами, мелкого размера, с эозинофильной цитоплазмой. В окружающей бронхиоле – фиброзные изменения.

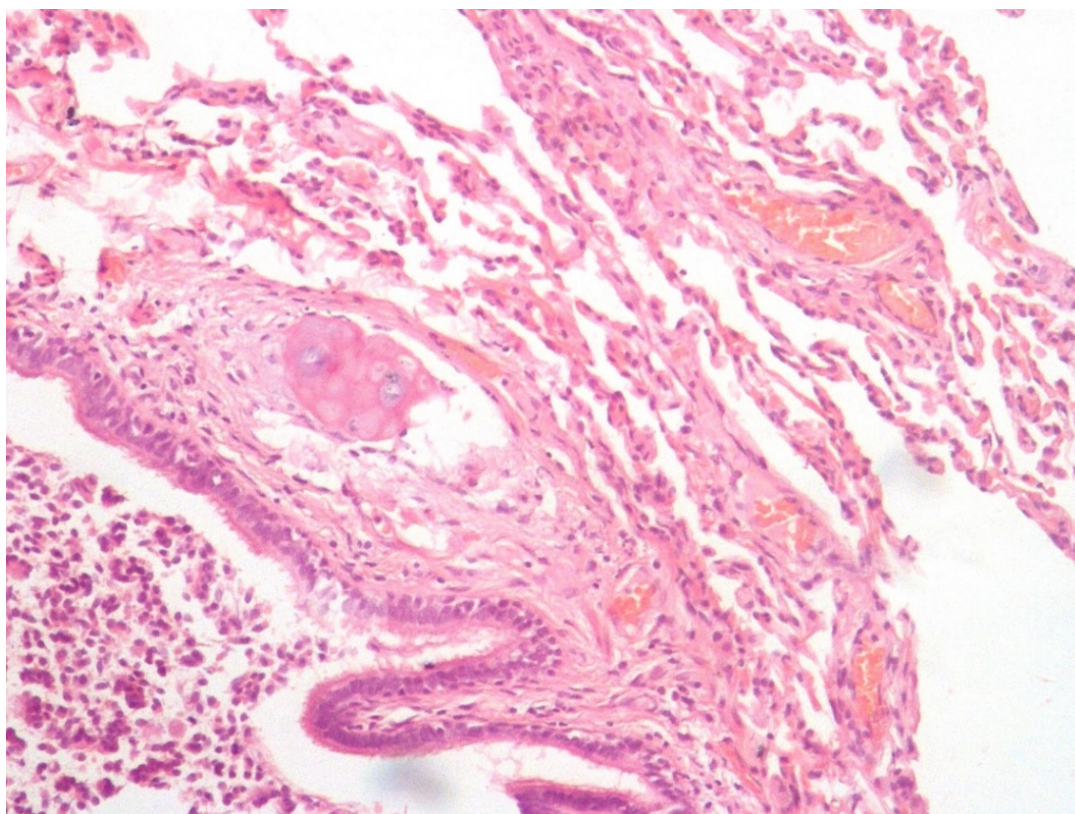


Рисунок 3 - Терминальная бронхиола: группа клеток хрящевой ткани в стенке. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

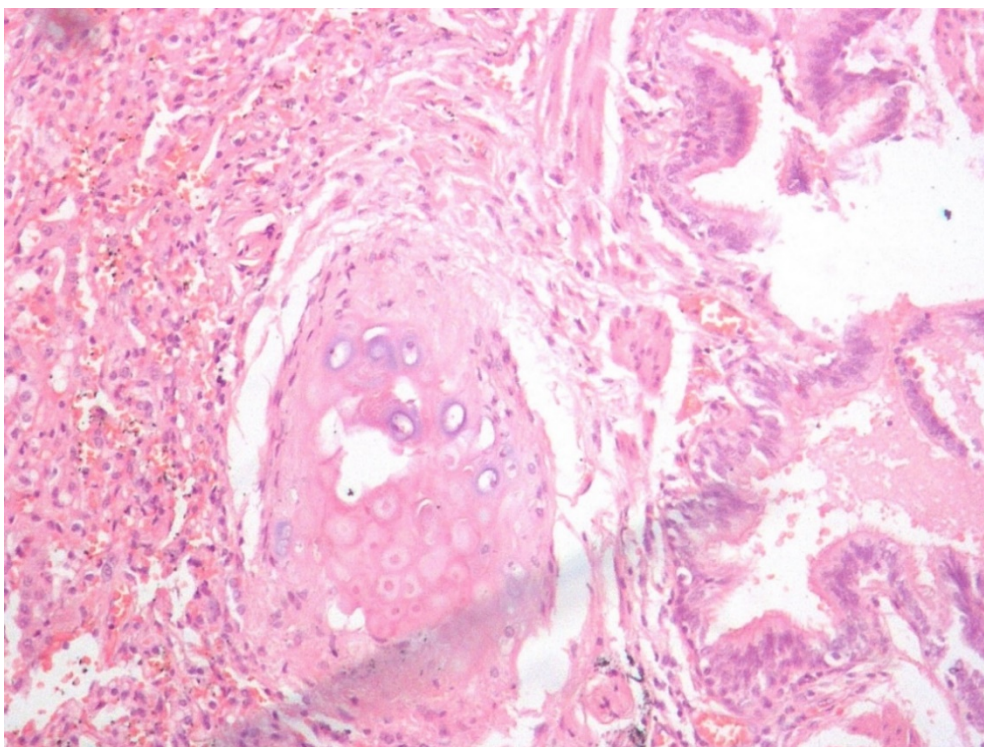


Рисунок 4 - Терминальная бронхиола: клетки хрящевой ткани. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

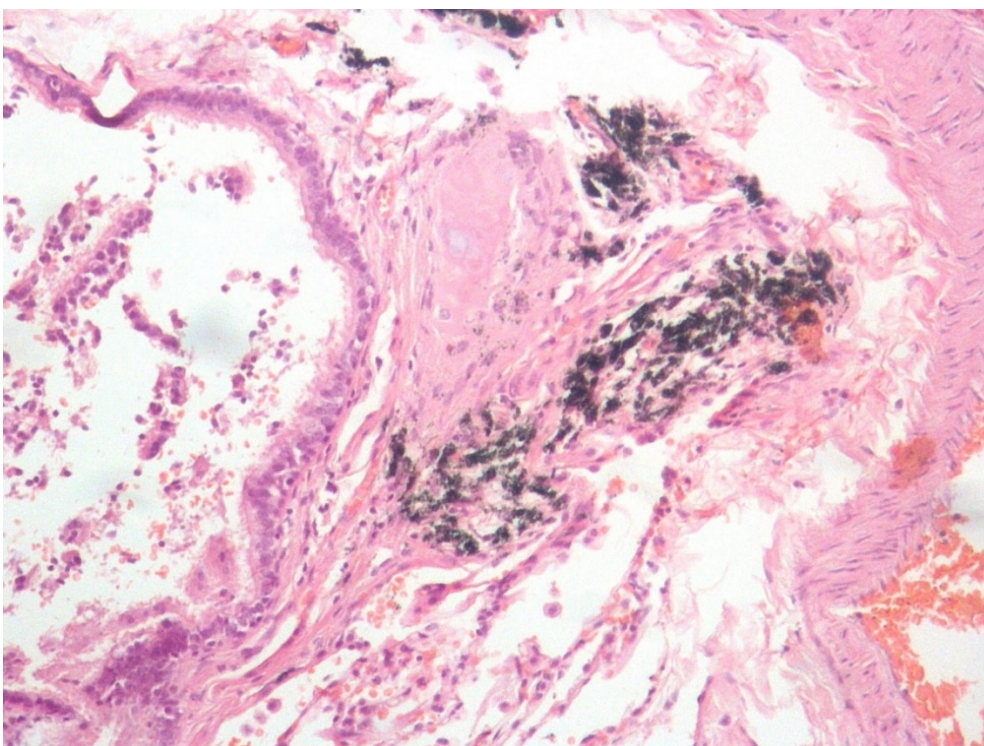


Рисунок 5 - Стенка терминальной бронхиолы: группа клеток хрящевой ткани в участке фиброза. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.



В следующей группе препаратов на Рис. 6, 7 и 8 отмечается значительное увеличение количества межклеточного вещества, которое окрашивается как базофильно, так и эозинофильно в различных участках. Клетки преимущественно крупные, округлые, с мелким базофильным ядром, расположенным преимущественно апикально. Образования также располагаются перибронхиально. Наблюдаются фиброзные изменения в окружающей их ткани бронхиолы.

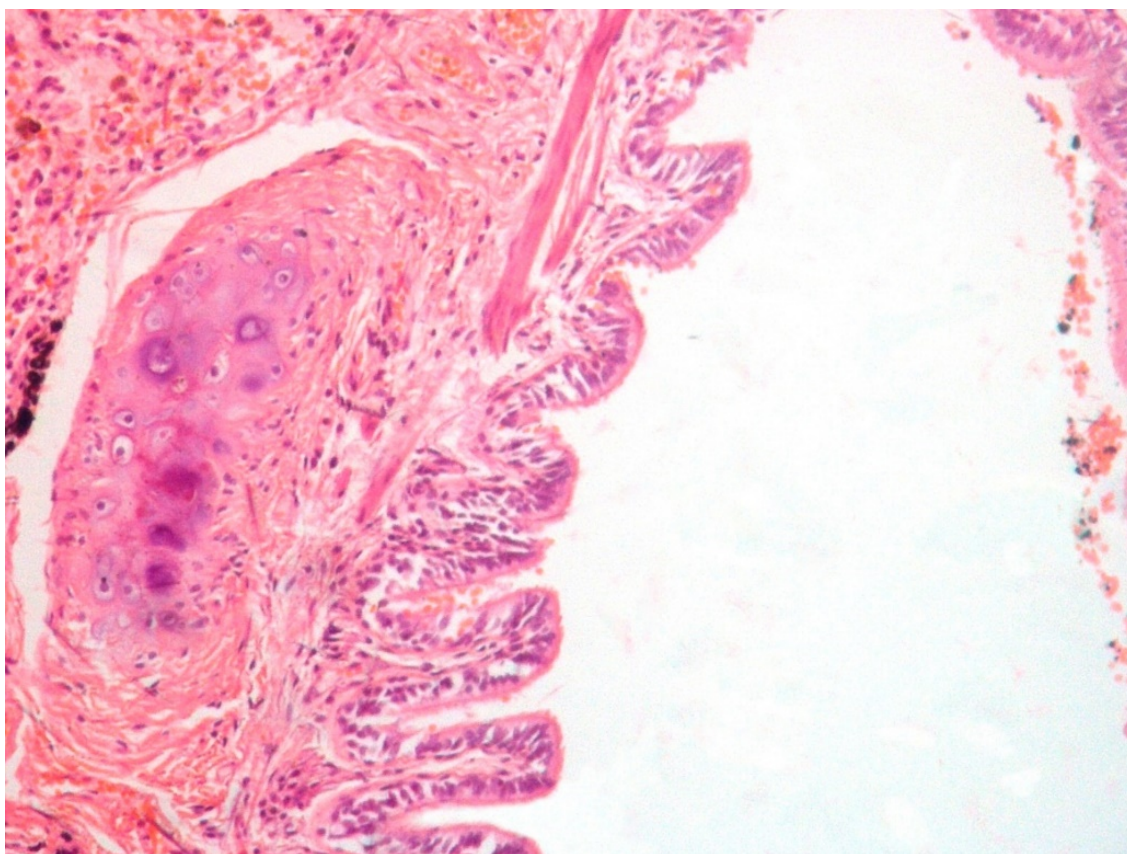


Рисунок 6 - Хрящ в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

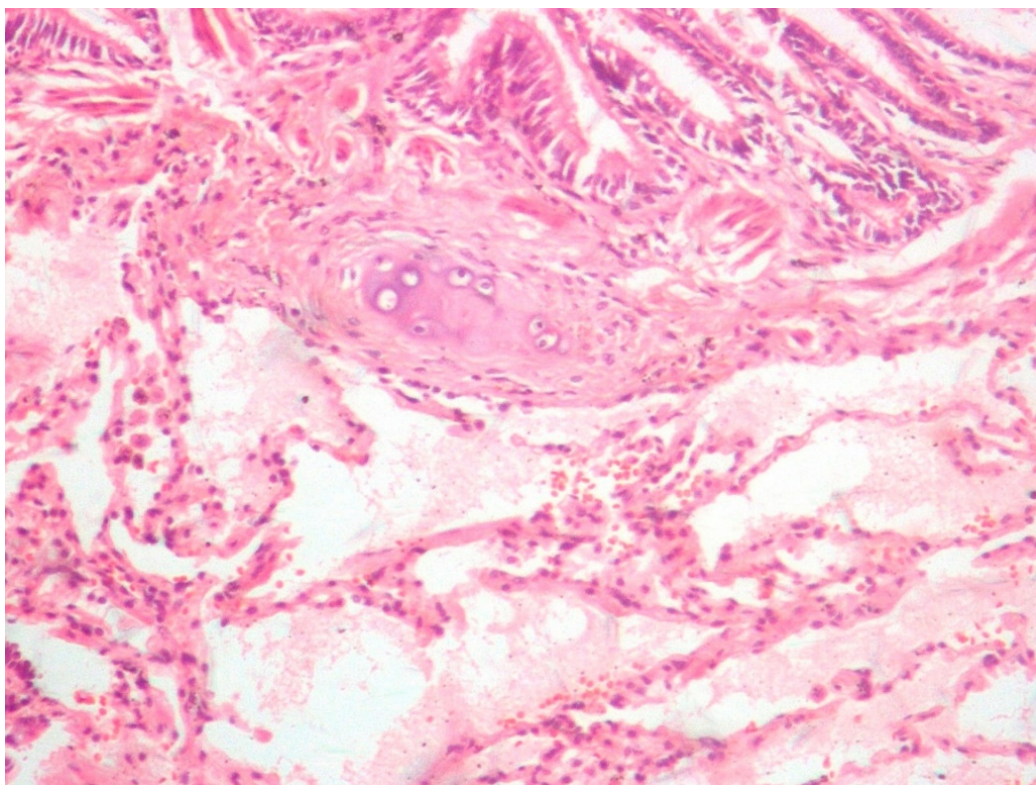


Рисунок 7 - Образование в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

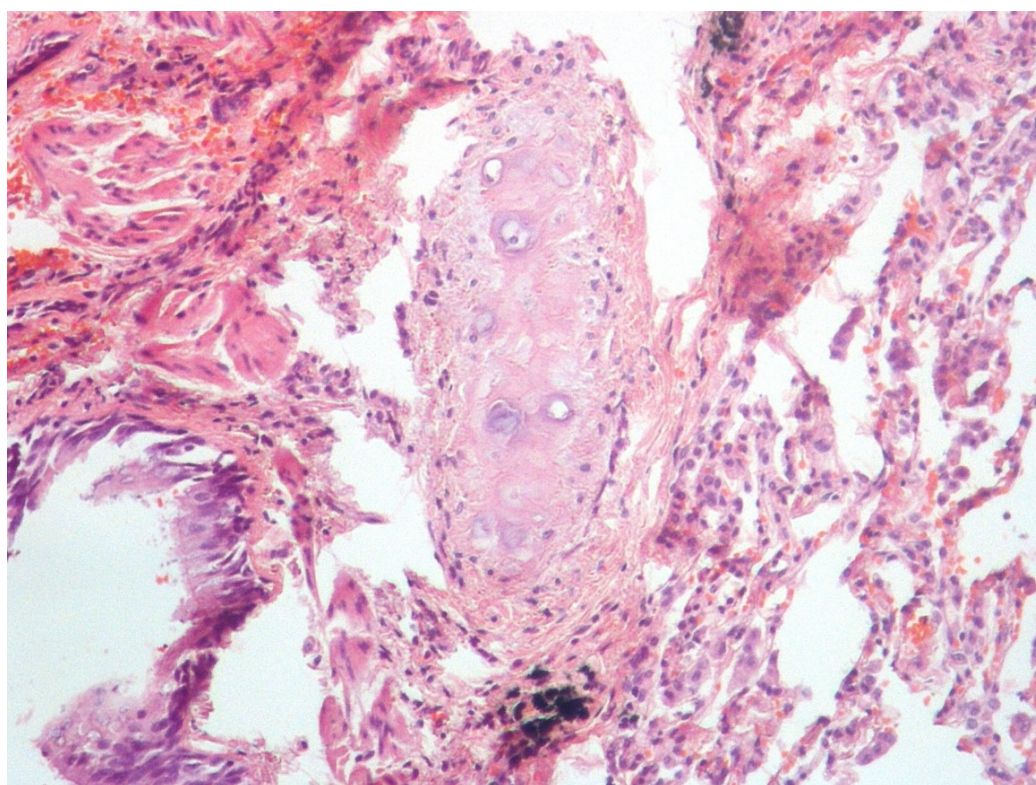


Рисунок 8 - Образование в стенке терминальной бронхиолы: хрящевая и гладкомышечная ткань. Окраска гематоксин-эозин, увеличение x100.



Образования, представленные на Рис 9 и 10 имеют межклеточное вещество, окрашенное базофильно. Клетки также округлой формы с мелким темным ядром, расположенным на периферии, цитоплазма не окрашивается или окрашена слабо базофильно. При этом на Рис. 9 отмечается, что более зрелые клетки с выраженным матриксом занимают центральное положение, тогда как на периферии их окружает слой более мелких клеток, прилежащих плотно друг к другу, с относительно крупным плотным ядром и светлой цитоплазмой. На Рис. 9 клетки, входящие в состав образования напоминают по своему взаиморасположению изогенные группы хондроцитов гиалинового хряща

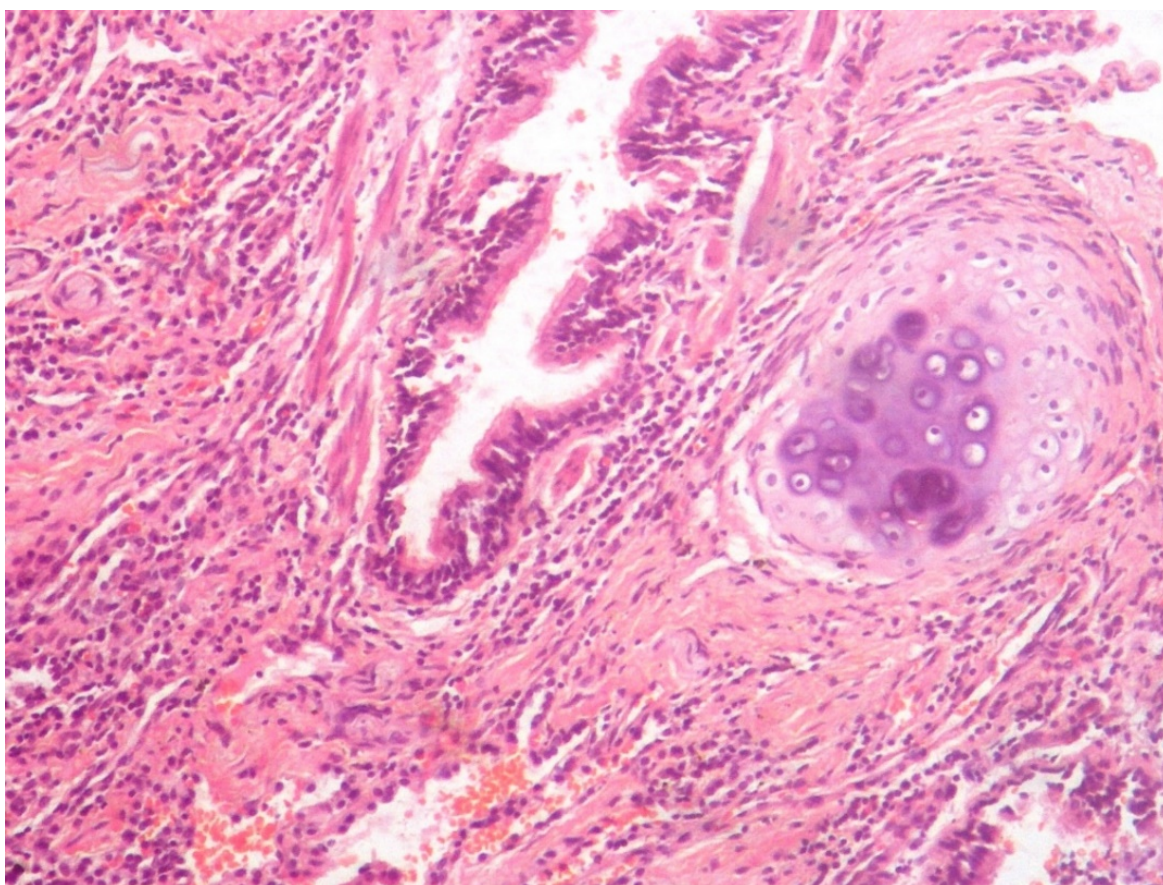


Рисунок 9 - Стенка терминальной бронхиолы с клетками хрящевой ткани. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

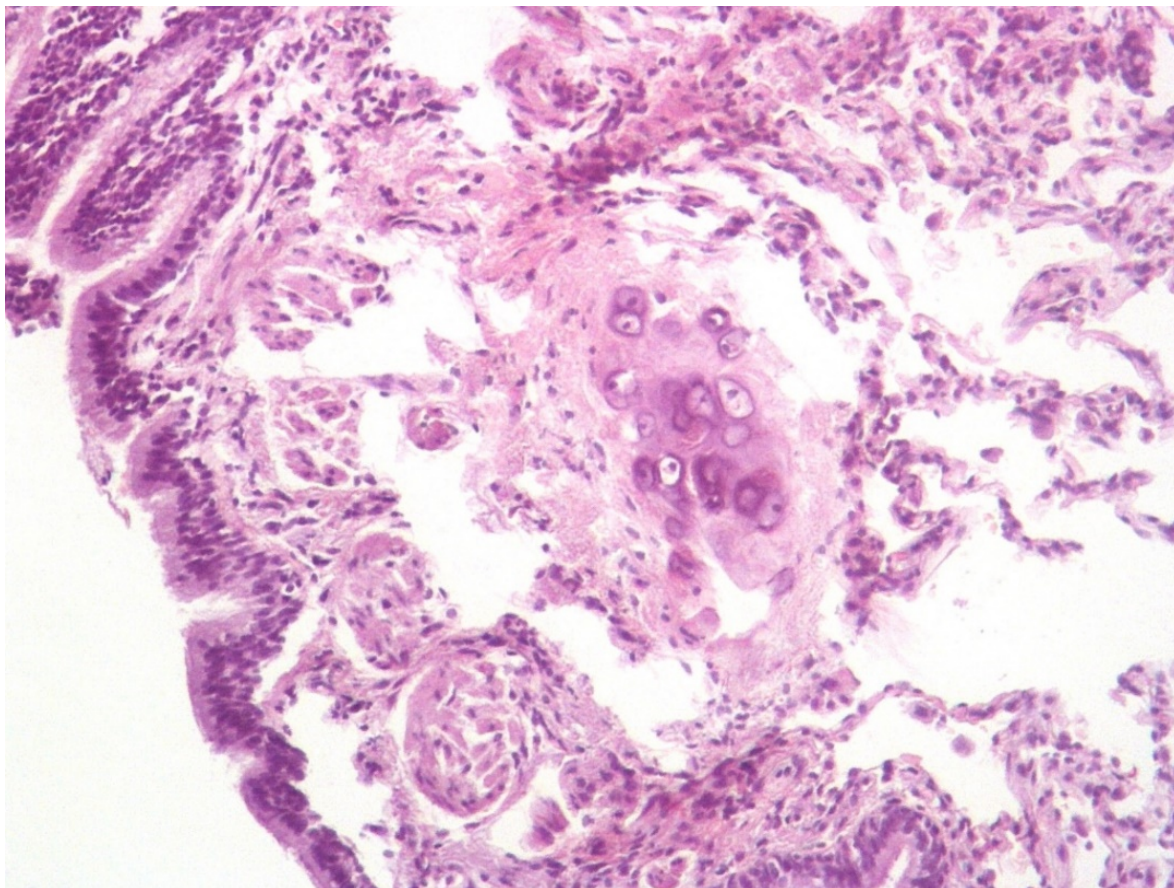


Рисунок 10 - Образование из хрящевой ткани в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение x100.



Структура, представленная, на Рис. 11 также состоит из крупных клеток с мелким базофильным ядром, расположенным преимущественно на периферии. Межклеточное вещество значительно выражено, гомогенное, окрашивается базофильно. Такая структура еще сильнее по своей морфологии напоминает обычный гиалиновый хрящ.

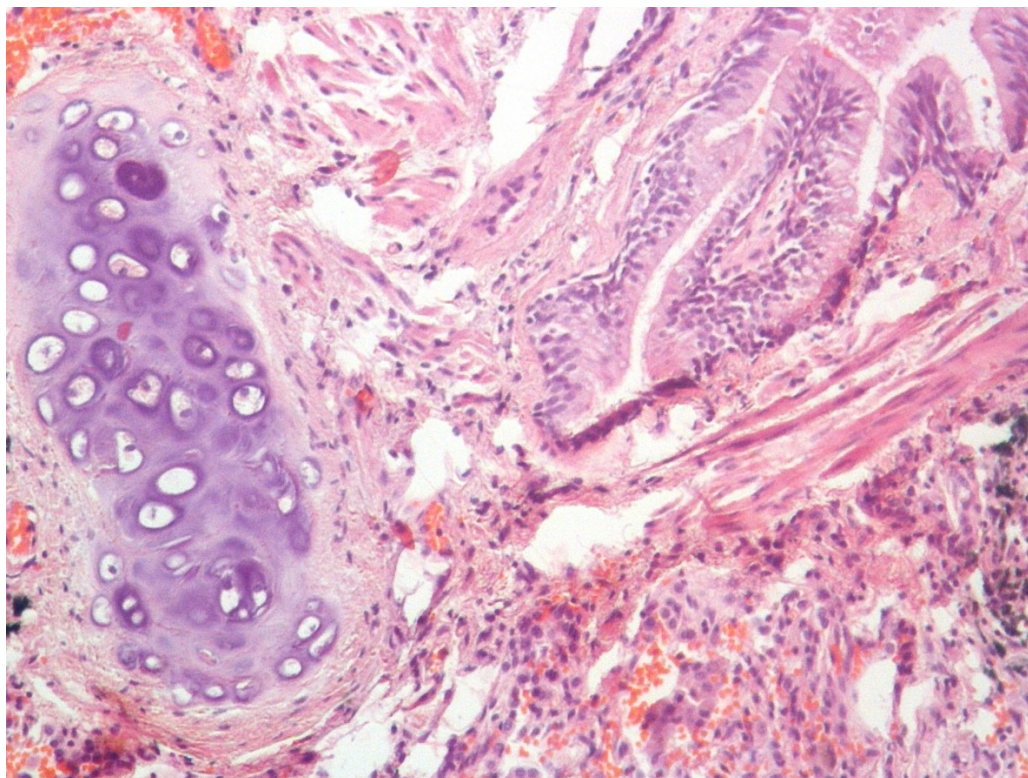


Рисунок 11 – Хрящевая ткань в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

На Рис. 12 представлена типичная гистологическая картина гиалинового хряща. Хрящ располагается в стенке терминальной бронхиолы. Хорошо выраженное базофильное межклеточное вещество, хондроциты заключены в лакуны, имеют мелкое ядро и светлую цитоплазму.

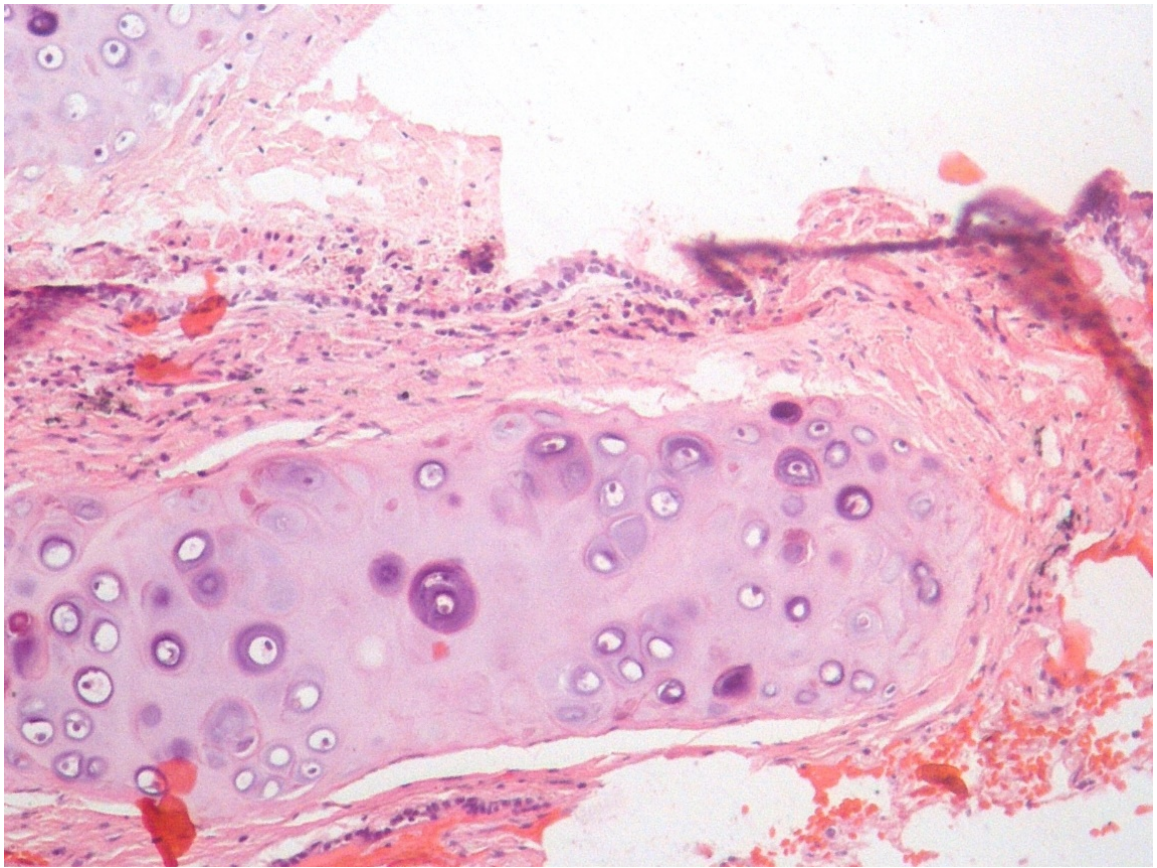


Рисунок 12 – Хрящевая ткань в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x200.

На Рис. 13 и 14 представлены фрагменты гиалинового хряща с дегенеративными изменениями: в центре наблюдается кариопикноз, кариорексис, деструкция клеток и нарушение структуры межклеточного вещества. На периферии сохраняются клетки округлой формы с мелким базофильным ядром и светлой цитоплазмой, окруженные базофильным матриксом.



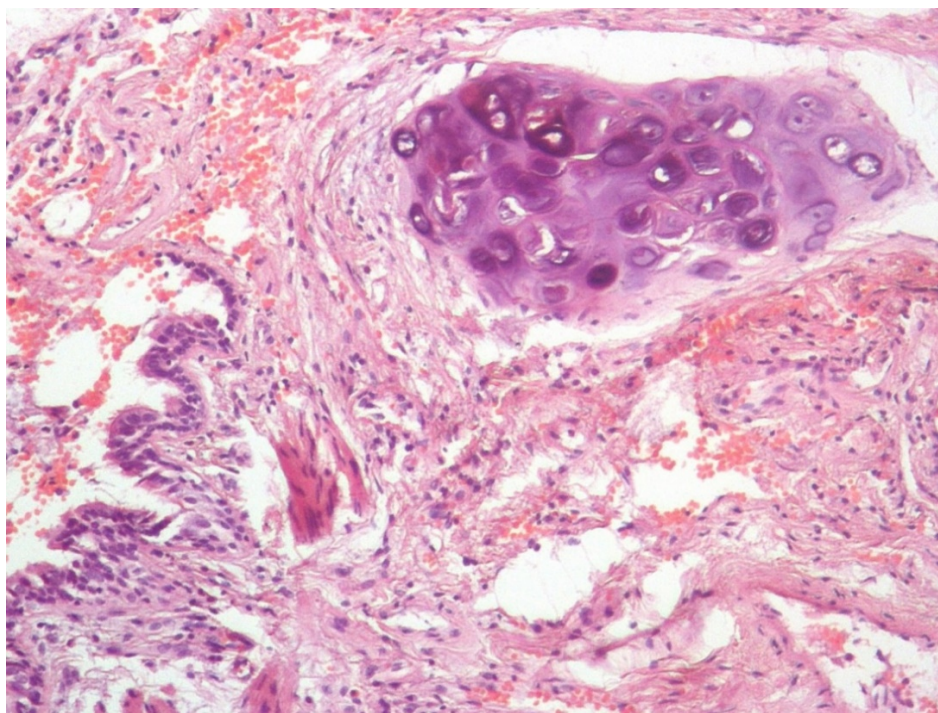


Рисунок 13 – Дистрофические изменения хрящевой ткани в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100.

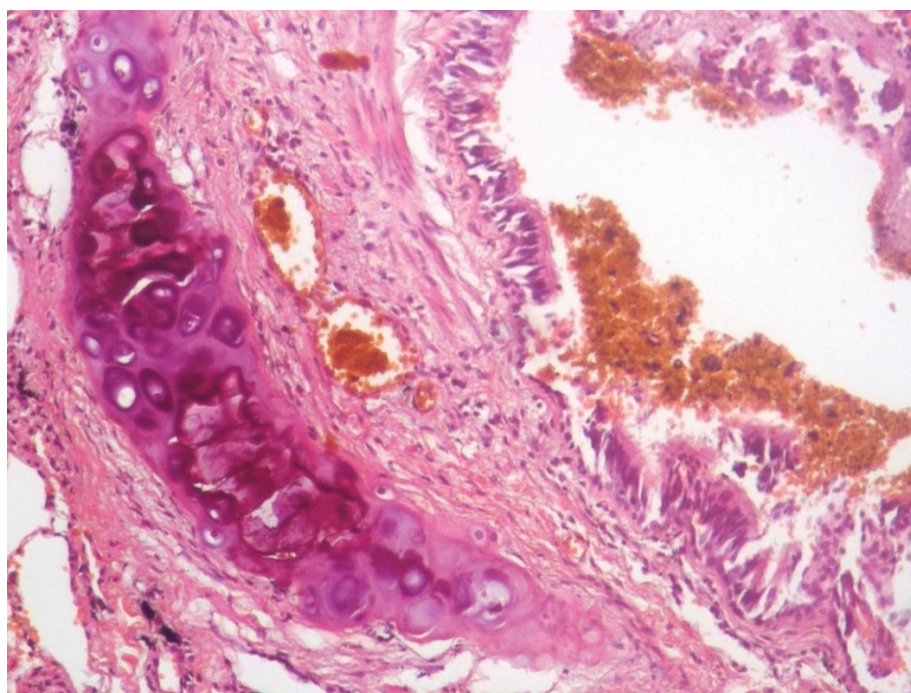


Рисунок 14 – Дистрофические и некробиотические изменения хрящевой ткани в стенке терминальной бронхиолы. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение x100.

На рис. 15 представлен фрагмент препарата фибролейомиоматозной гамартомы, а именно кровеносный сосуд в прилежащей к узлу опухоли ткани легкого. Отмечается гиперплазия гладкомышечных клеток меди и мезенхимальных элементов, подобная картина наблюдалась, кроме того, и в некоторых препаратах хондроидной гамартомы легкого.

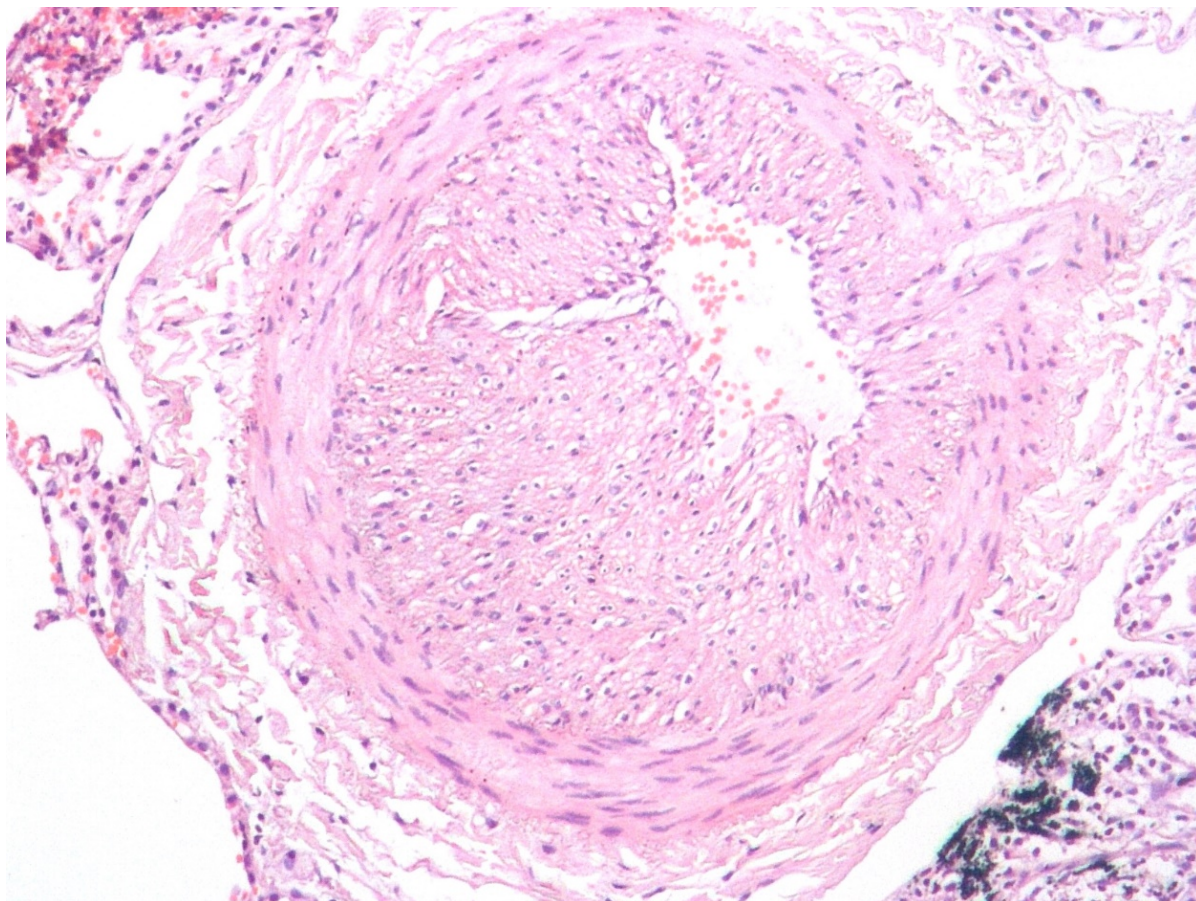


Рисунок 15 – Сосуд с элементами гиперплазии в прилежащей к лейомиоматозной гамартоме ткани легкого. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение x100.

При исследовании фиброзных гамартом легкого в прилежащей легочной ткани признаков пролиферации мезенхимальных элементов выявлено не было.



## Заключение

Ретроспективная оценка данных заключений показала, что в рамках данного исследования гамартомы легкого выявлялись в равной степени часто у мужчин и у женщин, что отличается данных предыдущих исследований, в которых сообщалось, что мужчины болеют примерно в 3 раза чаще. Пик заболеваемости приходится на 50–60 лет, что соответствует данным предыдущих исследований.

При оценке полученных гистологических данных можно предположить, что найденные образования, представленные на Рис. 3-15 представляют собой не что иное как стадии развития хрящевой ткани, которое, скорее всего, предшествует формированию хондронидной гамартомы легкого. Таким образом, можно выделить несколько последовательных стадий.

1. Группа клеток большого размера, относительно окружения, с мелким светлым гомогенным ядром, расположенном преимущественно центрально. Цитоплазма без включений, окрашена слабо эозинофильно. Межклеточное вещество практически отсутствует. Рис. 3-6.
  - а. Кроме того, в некоторых препаратах на периферии от зреющего хряща встречаются клетки с неокрашенной цитоплазмой, мелким ядром, малым количеством межклеточного вещества.
  - б. С увеличением доли межклеточного вещества вокруг некоторых клеток можно отметить появление базофильного окрашивания матрикса. Рис. 3-8.
2. Далее в процессе созревания хряща отмечается увеличение объема межклеточного матрикса, который окрашен базофильно, гомогенен, не содержит включений. Клетки округлой формы с мелким ядром, распределены хаотично. Рис. 7-10.
3. Формирование структур, морфологически напоминающих зрелый гиалиновый хрящ. Преобладает гомогенное базофильно окрашенное

межклеточное вещество. Клетки небольшого размера с мелким ядром, расположенным преимущественно апикально, формируют структуры, напоминающие лакуны зрелого гиалинового хряща. Рис. 11-12.

4. Зрелый хрящ может подвергаться дегенерации: нарушение структуры межклеточного вещества, кариорексис, некроз клеток. На периферии располагаются незрелые клетки с малым количеством межклеточного вещества, эозинофильной цитоплазмой без включений и мелким ядром. Рис. 13-14.

Морфологическая картина, которая соответствует раннему этапу развития хондронидной гамартомы легкого Рис. 3-7 сходна с таковой, характерной для эмбрионального этапа развития хрящей трахеи и крупных бронхов, когда эти хрящи образуются из мезенхимальных стволовых клеток, и представляют собой крупные округлые клетки с мелким ядром, слабо-эозинофильной цитоплазмой и малым количеством межклеточного вещества [41].

По данным иммуногистохимического исследования нормального бронхиального хряща новорожденных, была выявлена иммуногистохимическая реактивность к практически тем же маркерам, что и в хондронидной гамартоме легкого. Также в образцах ткани бронхов новорожденных были обнаружены примитивные мезенхимальные клетки, которые по своим иммуногистохимическим характеристикам не могут быть отнесены ни к хрящевой, ни к гладкомышечной ткани. Эти мезенхимальные клетки могут в последствии дифференцироваться в гладкомышечную ткань, хрящ и другие производные мезенхимы. Таким образом, такие клетки могут оставаться в стенке бронха взрослого человека и быть предшественниками гамартом легкого. [14]

Несмотря на то, что в большинстве из представленных в литературе случаев гамартомы легкого негативно окрашиваются иммуногистохимически на CD34, тем не менее имеется информация и о CD34 позитивных гамартомах [Miyaoaka et al]. Учитывая, что CD34 положительные стромальные клетки по

данным Díaz-Flores L et al. являются клетками предшественниками с высоким потенциалом дифференцировки, можно предположить, что в данном подобные клетки могут являться предшественниками гамартоты легкого. [42]

Данных касательно лейомиоматозного и фиброзного типов гамартот легкого оказалось недостаточно в силу чрезвычайной редкости данных гамартот, поэтому описать их морфогенез в рамках данной работы не представляется возможным.

Тем не менее решение вопроса о идентификации клеток предшественников гамартот еще предстоит в будущих исследованиях с применением ИГХ для определения маркеров стволовых клеток.

## Выводы

Хондроидная гамартома легкого преодолевает несколько последовательных этапов в ходе морфогенеза:

1. Группа клеток большого размера, относительно окружения, с мелким светлым гомогенным ядром, расположенном преимущественно центрально. Цитоплазма без включений, окрашена слабо-эозинофильно. Межклеточное вещество практически отсутствует.
  - a. Кроме того, в некоторых препаратах на периферии от зреющего хряща встречаются клетки с неокрашенной цитоплазмой, мелким ядром, малым количеством межклеточного вещества.
  - b. С увеличением доли межклеточного вещества вокруг некоторых клеток можно отметить появление базофильного окрашивания матрикса.
2. Далее в процессе созревания хряща отмечается увеличение объема межклеточного матрикса, который окрашен базофильно, гомогенен, не содержит включений. Клетки округлой формы с мелким ядром, распределены хаотично.
3. Формирование структур, морфологически напоминающих зрелый гиалиновый хрящ. Преобладает гомогенное базофильно окрашенное межклеточное вещество. Клетки небольшого размера с мелким ядром, расположенным преимущественно апикально, формируют структуры, напоминающие лакуны зрелого гиалинового хряща.
4. Зрелый хрящ может подвергаться дегенерации: нарушение структуры межклеточного вещества, кариорексис, некроз клеток. На периферии располагаются незрелые клетки с малым количеством межклеточного вещества, эозинофильной цитоплазмой без включений и мелким ядром.

## Список литературы

1. Visvader J.E. Cells of origin in cancer // *Nature*. 2011. Vol. 469, № 7330. P. 314–322.
2. Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer // *Nature Cell Biology*. 2013. Vol. 15, № 2. P. 126–134.
3. Васильев Н.В., Самцов Е.Н. Гамартома легких: предмет исследования и опыт наблюдения // *Сибирский онкологический журнал*. 2008. Vol. , № 3.
4. Blair C.T., McElvein R.B. Hamartoma of the Lung // *Diseases of the Chest*. 1963. Vol. 44, № 3. P. 296–302.
5. Tomashefski J.F. Benign endobronchial mesenchymal tumors // *The American Journal of Surgical Pathology*. 1982. Vol. 6, № 6. P. 531–540.
6. Bateson E.M. Histogenesis of intrapulmonary and endobronchial hamartomas and chondromas (cartilage-containing tumours): A hypothesis // *The Journal of Pathology*. 1970. Vol. 101, № 2. P. 77–83.
7. Perez-Atayde A.R., Seiler M.W. Pulmonary hamartoma. An ultrastructural study // *Cancer*. 1984. Vol. 53, № 3. P. 485–492.
8. Fraire A.E., Dail D.H. Mesenchymal tumors, Part II: Tumors of hamartomatous, osteochondromatous, lipomatous, neural, and vascular origin // *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*. Springer, New York, NY, 2008. P. 462–499.
9. Fletcher J.A. et al. Cytogenetic and histologic findings in 17 pulmonary chondroid hamartomas: Evidence for a pathogenetic relationship with lipomas and leiomyomas // *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1995. Vol. 12, № 3. P. 220–223.
10. van den Bosch J.M. et al. Mesenchymoma of the lung (so called hamartoma): a review of 154 parenchymal and endobronchial cases. // *Thorax*. 1987. Vol. 42, № 10. P. 790–793.

11. Gjevre J.A., Myers J.L., Prakash U.B.S. Pulmonary Hamartomas // Mayo Clinic Proceedings. 1996. Vol. 71, № 1. P. 14–20.
12. McDonald J.R., Harrington S.W., Clagett O.T. Hamartoma (often called chondroma) of the lung // Journal of Thoracic Surgery. 1945. Vol. 14, № 2. P. 128–143.
13. King T.C., Myers J. Isolated Metastasis to a Pulmonary Hamartoma // The American Journal of Surgical Pathology. 1995. Vol. 19, № 4. P. 472–475.
14. Takemura T. et al. An immunohistochemical study of the mesenchymal and epithelial components of pulmonary chondromatous hamartomas // Pathology International. 1999. Vol. 49, № 11. P. 938–946.
15. Bateson E.M. So-called hamartoma of the lung-a true neoplasm of fibrous connective tissue of the bronchi // Cancer. 1973. Vol. 31, № 6. P. 1458–1467.
16. Zhang X.-T. et al. Peripheral mucous gland adenoma of the lung with parenchymal involvement and smooth muscle in the stroma // Medicine. 2018. Vol. 97, № 3. P. e9597.
17. Takeshima Y., Furukawa K., Inai K. “Adenomyomatous” hamartoma of the lung // Pathology International. 2000. Vol. 50, № 12. P. 984–986.
18. Yamada R. et al. An unusual case of pulmonary hamartoma with predominant bronchial mucous glands in the peripheral lung // Pathology International. 2018. Vol. 68, № 7. P. 431–435.
19. Itoh H. et al. Solitary fibroleiomyomatous hamartoma of the lung in a patient without a pre-existing smooth-muscle tumor // Pathology International. 2001. Vol. 51, № 8. P. 661–665.
20. Kato N. et al. Multiple pulmonary leiomyomatous hamartoma with secondary ossification // Pathology International. 1999. Vol. 49, № 3. P. 222–225.

21. Rossi G. et al. Mucinous Adenomyomatous Pulmonary Hamartoma: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features of 6 Cases // International Journal of Surgical Pathology. 2020. Vol. 29, № 3. P. 273–280.
22. Okudela K. et al. A case of pulmonary hamartoma with distinctive histopathological features: A discussion of its differential diagnosis and histogenesis // Pathology International. 2014. Vol. 2, № 1. P. n/a-n/a.
23. Miyaoka M. Giant Pulmonary Hamartoma with Dominant CD34-Positive Smooth Muscle Cell Component // The Tokai journal of experimental and clinical medicine. 2018. Vol. 43, № 1. P. 1–4.
24. Chatzopoulos K., Johnson T.F., Boland J.M. Clinical, Radiologic, and Pathologic Characteristics of Pulmonary Hamartomas With Uncommon Presentation // American Journal of Clinical Pathology. 2020. Vol. 155, № 6. P. 903–911.
25. Lowry W. E. Signaling in adult stem cells // Frontiers in Bioscience. 2007. Vol. 12, № 8-12. P. 3911.
26. Nishikawa S.-I. . et al. Niche Required for Inducing Quiescent Stem Cells // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 2008. Vol. 73, № 0. P. 67–71.
27. Quiñones-Hinojosa A. et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells // The Journal of Comparative Neurology. 2005. Vol. 494, № 3. P. 415–434.
28. Stingl J. et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells // Nature. 2006. Vol. 439, № 7079. P. 993–997.
29. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2006. Vol. 22, № 1. P. 339–373.
30. Barker N., Bartfeld S., Clevers H. Tissue-Resident Adult Stem Cell Populations of Rapidly Self-Renewing Organs // Cell Stem Cell. 2010. Vol. 7, № 6. P. 656–670.

31. Stanger B.Z., Tanaka A.J., Melton D.A. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver // *Nature*. 2007. Vol. 445, № 7130. P. 886–891.
32. Dor Y. et al. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation // *Nature*. 2004. Vol. 429, № 6987. P. 41–46.
33. Choi T. et al. Extensive Conversion of Hepatic Biliary Epithelial Cells to Hepatocytes After Near Total Loss of Hepatocytes in Zebrafish // *Gastroenterology*. 2014. Vol. 146, № 3. P. 776–788.
34. Lawson D.A. et al. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 104, № 1. P. 181–186.
35. Sangiorgi E., Capecchi M.R. *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells // *Nature Genetics*. 2008. Vol. 40, № 7. P. 915–920.
36. Van Landeghem L. et al. Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012. Vol. 302, № 10. P. G1111–G1132.
37. Moore K.A. Stem Cells and Their Niches // *Science*. 2006. Vol. 311, № 5769. P. 1880–1885.
38. Metzger D. et al. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995. Vol. 92, № 15. P. 6991–6995.
39. Jackson E.L. et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras // *Genes & Development*. 2001. Vol. 15, № 24. P. 3243–3248.



40. Alcantara Llaguno S. et al. Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model // Cancer Cell. 2009. Vol. 15, № 1. P. 45–56.
41. Raman R. et al. Evaluation of Organogenesis & Morphogenesis of Kidney in Human Fetuses at Different Weeks of Gestation // Journal of Medical Science And clinical Research. 2015. Vol. 2, № 1.
42. Díaz-Flores L. et al. CD34+ Stromal Cells/Telocytes as a Source of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, № 7. P. 3686.